

<b>(51) Internationale Patentklassifikation 5 :</b> <b>A61K 39/395, C07K 15/28 C12P 21/08, C12N 5/00</b>		<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 93/12816</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> <b>8. Juli 1993 (08.07.93)</b>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> <b>PCT/EP92/02905</b>		<b>(74) Anwälte:</b> SCHREINER, Siegfried usw.; Boehringer Mannheim GmbH, Sandhoferstr. 116, D-6800 Mannheim 31 (DE).	
<b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> <b>15. Dezember 1992 (15.12.92)</b>			
<b>(30) Prioritätsdaten:</b> <b>P 41 42 552.9</b>	<b>21. Dezember 1991 (21.12.91) DE</b>	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
<p><b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BOEH-RINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhoferstr. 116, D-6800 Mannheim 31 (DE).</p> <p><b>(72) Erfinder; und</b>  <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> SCHEUER, Werner [DE/DE]; Barbarastraße 49, D-8122 Penzberg (DE). HÜBNER-PARAJSZ, Christa [AT/DE]; Marienstr. 11, D-8132 Tutzing (DE). TIBES, Ulrich [DE/DE]; Am Sandberg 102, D-6000 Frankfurt 70 (DE).</p>			<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
<p><b>(54) Title:</b> MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST TYPE I PHOSPHOLIPASE A<sub>2</sub>, USED AS A THERAPEUTIC AGENT TO REDUCE INFLAMMATION</p> <p><b>(54) Bezeichnung:</b> MONOKLONALE ANTIKÖRPER GEGEN DIE TYP I-PHOSPHOLIPASE A<sub>2</sub> ALS ENTZÜNDUNGSHEMMENDES THERAPEUTIKUM</p> <p><b>(57) Abstract</b></p> <p>The invention concerns the use of monoclonal antibodies against type I phospholipase A<sub>2</sub> in the preparation of a therapeutic agent to reduce inflammation. This agent is particularly suitable for use in cases of acute pancreatitis.</p> <p><b>(57) Zusammenfassung</b></p> <p>Die Erfindung betrifft die Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen die Typ I-Phospholipase A<sub>2</sub> zur Herstellung eines entzündungshemmenden Therapeutikums, das sich insbesondere zur Anwendung bei akuter Pankreatitis eignet.</p>			

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

**Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.**

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	PL	Polen
BJ	Benin	IE	Irland	PT	Portugal
BR	Brasilien	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SK	Slowakischen Republik
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CZ	Tschechischen Republik	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
DK	Dänemark	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam

**Monoklonale Antikörper gegen die Typ I-Phospholipase A<sub>2</sub> als entzündungshemmendes Therapeutikum**

Die Erfindung betrifft die Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen die Typ I-Phospholipase A<sub>2</sub> zur Herstellung eines entzündungshemmenden Therapeutikums, das sich insbesondere zur Anwendung bei akuter Pankreatitis eignet.

Für die akute Pankreatitis existiert weder eine kausale noch eine symptomatische Therapie (The Merck Manual of Diagnosis and Therapy 15 (1987), Seite 763-767). Pathogenetische Grundlage der akuten Pankreatitis ist eine Autolyse des Pankreas. Hierbei wird der Phospholipase A<sub>2</sub> eine entscheidende Funktion zugeschrieben. Sie wirkt lysierend auf die Zellmembran und setzt dabei aus Membranphospholipiden Arachidonsäure frei. Die Metabolite der Arachidonsäure (Prostaglandine und Leukotriene) sind wesentlicher Bestandteil der Entzündungsreaktion.

Die Phospholipase A<sub>2</sub> kommt in zwei Formen vor. Die als Typ I bezeichnete Phospholipase A<sub>2</sub> wird im wesentlichen im Pankreasgewebe gefunden und spielt bei der akuten Pankreatitis eine entscheidende Rolle. Dagegen ist die Typ II Phospholipase A<sub>2</sub> in vielen verschiedenen Geweben anzutreffen.

In der EP-A 0 248 597 werden niedermolekulare Hemmstoffe der Phospholipase A<sub>2</sub> beschrieben, die eine entzündungshemmende Wirkung bei der Maus aufweisen. Für eine etwa 80 %-ige Hemmung ist jedoch eine Applikation von 200 - 400 µg dieser Verbindungen notwendig. Bei derart hohen Dosierungen schränken Nebenwirkungen dieser niedermolekularen Inhibitoren deren therapeutische Anwendbarkeit deutlich ein. Diesen Nachteil weist auch der in der JP 088193 beschriebene Inhibitor der Phospholipase A<sub>2</sub> auf, der mit einer täglichen Dosierung von 100 bis 1000 mg bei erwachsenen Patienten zur Therapie einer Pankreatitis vorgeschlagen wird. Die in der EP-A 0 405 864 beschriebenen Phospholipase A<sub>2</sub>-Inhibitoren aus dem Mikroorganismus *Circinotrichum falcatisporum* weisen für die Hemmung von gereingter Rattenphospholipase A<sub>2</sub> IC<sub>50</sub>-Werte von 17,5 bis über 300 µg/ml auf und müßten somit bei einer therapeutischen Anwendung ebenfalls sehr hoch dosiert werden.

Als weiterer Inhibitor der Phospholipase A<sub>2</sub> weist auch das 37 kD große Lipocortin eine entzündungshemmende Wirkung auf (B. Wallner et.al., Nature 320 (1986), 77-81). Wegen seiner geringen Stabilität eignet sich Lipocortin jedoch nicht für eine therapeutische Verwendung. In der EP-A 0 327 334 werden daher 15-26 Aminosäuren große Peptide beschrieben, die eine hemmende Wirkung auf die Phospholipase A<sub>2</sub> aufweisen. Lediglich bei einem dieser Peptide liegt jedoch der IC<sub>50</sub>-Wert unter 10 µg/ml. Es wird jedoch nicht gezeigt, daß dieses Peptid aus 16 ungeschützten Aminosäuren eine höhere Stabilität als Lipocortin aufweist.

Von K. Takayama et.al. (Biochem. Biophys. Res. Comm. 167 (1990), 1309-1315) werden monoklonale Antikörper gegen die menschliche Phospholipase A<sub>2</sub> aus der Synovialflüssigkeit beschrieben, die jedoch nicht an die Phospholipase A<sub>2</sub> aus dem Pankreas binden.

In EP-A 0 287 397 und J. Clin. Biochem. Nutr. 11 (1991), 79 - 89 werden monoklonale Antikörper gegen die Phospholipase A<sub>2</sub> aus dem Pankreas beschrieben. Einige dieser Antikörper hemmen die enzymatische Aktivität der Phospholipase A<sub>2</sub> mit einer IC<sub>50</sub> von 0,2 ng/ml. Es wird jedoch lediglich eine diagnostische Verwendung dieser Antikörper beschrieben.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es dagegen, einen Hemmstoff für die Phospholipase A<sub>2</sub> zur Verfügung zu stellen, dessen inhibitorische Wirkung die Verwendung dieses Hemmstoffs als Therapeutikum gegen die akute Pankreatitis ermöglicht.

Diese Aufgabe wird gelöst durch die Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen die Typ I-Phospholipase A<sub>2</sub>, die bei einer Konzentration von weniger als 100 ng/ml eine mindestens 50 %-ige Hemmung der Aktivität der Phospholipase A<sub>2</sub> bewirken, oder funktioneller Fragmente dieser Antikörper, zur Herstellung eines Therapeutikums, das bei Entzündungserscheinungen, speziell bei akuter Pankreatitis eingesetzt werden kann.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß mit einem monoklonalen Antikörper gegen die Typ I Phospholipase A<sub>2</sub> oder einem funktionellen Derivat eines solchen Antikörpers ein besonders effizientes Therapeutikum gegen Entzündungsreaktionen, insbesondere gegen akute Pankreatitis, Psoriasis, Peritonitis oder Sepsis erhalten werden kann. Neben den vollständigen Antikörpern sind hierfür auch funktionelle Antikörperfragmente wie monoklonale Fab- oder F(ab')-Fragmente, sowie divalente F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente geeignet.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher eine pharmazeutische Formulierung, bestehend aus einem monoklonalen

Antikörper gegen die Typ I-Phospholipase A<sub>2</sub> oder einem funktionellen Derivat dieses Antikörpers, gegebenenfalls zusammen mit den üblichen pharmazeutischen Träger-, Füll-, Hilfs- und Zusatzstoffen, sowie ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Arzneimittels, das insbesondere zur Therapie der akuten Pankreatitis eingesetzt werden kann.

Für die erfindungsgemäße Verwendung haben sich die aus den Hybridomlinien DSM ACC2026 und DSM ACC2025 erhältlichen monoklonalen Antikörper als besonders geeignet erwiesen.

Ein weiterer bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind daher monoklonale Antikörper gegen die Typ I-Phospholipase A<sub>2</sub>, die in äquivalenter Weise an die Typ I-Phospholipase A<sub>2</sub> bindefähig sind, wie die aus den Zelllinien DSM ACC2026 und/oder DSM ACC2025 erhältlichen monoklonalen Antikörper gegen die Typ I-Phospholipase A<sub>2</sub>.

Unter dem Begriff "in äquivalenter Weise bindefähige Antikörper" werden Antikörper verstanden, bei denen eine Epitopüberlappung mit dem definierten bekannten Antikörper nachweisbar ist. Diese Epitopüberlappung kann mit Hilfe eines kompetitiven Testsystems leicht nachgewiesen werden. Dazu wird zum Beispiel mit Hilfe eines Enzymimmunoassays überprüft, in wie weit ein Antikörper mit dem bekannten Antikörper um die Bindung an ein definiertes Antigen bzw. ein spezielles Epitop konkurriert. Dazu inkubiert man das entsprechende Antigen mit dem bekannten monoklonalen Antikörper in markierter Form und einem Überschuß des in Betracht gezogenen Antikörpers. Durch Immobilisierung der gebildeten Komplexe, Trennung der festen von der flüssigen Phase und Nachweis der gebundenen Markierung in einer der beiden Phasen, kann dann leicht festgestellt werden, in wie weit der in Betracht gezogene Antikörper den definierten Antikörper

aus der Bindung verdrängen kann. Ist eine Verdrängung von mindestens 50 % bei  $10^5$ -fachen Überschuß gegeben, so liegt eine Epitopüberlappung vor.

Besonders bevorzugt sind die monoklonalen Antikörper gegen die Typ I-Phospholipase A<sub>2</sub>, die aus den Zelllinien DSM ACC2026 und/oder DSM ACC2025 erhältlich sind.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind die Zelllinien DSM ACC2026 und/oder DSM ACC2025.

Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper sind erhältlich durch Immunisierung mit gereinigter Phospholipase A<sub>2</sub>, Immortalisieren von Milzzellen der immunisierten Tiere und Klonierung derjenigen immortalisierten Zellen, deren Kulturüberstand einen Antikörper enthält, der eine Hemmung der Aktivität der Phospholipase A<sub>2</sub> mit einer IC<sub>50</sub> von weniger als 100ng/ml bewirkt. Die von diesen Klonen produzierten monoklonalen Antikörpern werden dann nach bekannten Verfahren isoliert.

Die Immunisierung wird in den hierfür üblicherweise verwendeten Tieren wie z.B. Mäusen oder Ratten durchgeführt. Vorzugsweise werden Mäuse verwendet.

Die Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere erfolgt vorzugsweise durch Fusionierung mit der Myelomzelllinie P3X63-Ag 8.653 (ATCC CRL 1580) gemäß der Methode nach J. of Imm. Meth. 39 (1980), 285-308. Daneben können aber auch andere, dem Fachmann geläufige Verfahren zur Immortalisierung der Milzzellen verwendet werden.

Zur Klonierung werden die Zellen zum Beispiel mittels eines floureszenzsaktivierten Zellsorters vereinzelt. Zum Nachweis

von immortalisierten Zellen, die den gewünschten Antikörper gegen Phospholipase A<sub>2</sub> produzieren, wird eine Probe des Kulturüberstandes in einem ELISA-Test auf Reaktivität mit der Phospholipase A<sub>2</sub> getestet. Um solche Antikörper zu erhalten, welche die enzymatische Aktivität der Phospholipase A<sub>2</sub> hemmen, wird der Kulturüberstand derjenigen Klone, die an die Phospholipase A<sub>2</sub> bindende Antikörper produzieren, zusätzlich auf die Hemmung der Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität in einem enzymatischen Test untersucht.

Diejenigen Klone, deren Kulturüberstand die gewünschte Hemmung der Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität ergibt, werden expandiert und die von diesen Klonen produzierten Antikörper nach bekannten Verfahren isoliert.

Die einen erfindungsgemäßen monokonalen Antikörper gegen die Phospholipase A<sub>2</sub> produzierenden Hybridomzelllinien DSM ACC2026 und DSM ACC2025 wurden am 10.12.1991 bei der Deutschen Sammlung von Zellkulturen und Mikroorganismen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D-3300 Braunschweig, hinterlegt.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele in Verbindung mit der Figur 1 erläutert.

Figur 1 zeigt die Hemmung der Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität durch die monokonalen Antikörper DSM ACC2026 (+) und DSM ACC2025

(□).

**Beispiel 1:****Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen die Typ I-  
Phospholipase A<sub>2</sub>**

12 Wochen alte Balb/C-Mäuse werden intraperitoneal mit 50 µg gereinigter Phospholipase A<sub>2</sub> (EC 3.1.1.4, V. Kozumplik et al., Biochim. Biophys. Acta 1002 (1989), 395 - 397) in komplettem Freund's Adjuvans immunisiert. Zwei nachfolgende Injektionen von jeweils 50 µg werden im Abstand von jeweils einem Monat mit inkomplettem Freund's Adjuvans gegeben. 3 Tage vor der Zellfusion erfolgt eine intravenöse Injektion von weiteren 50 µg in physiologischer Kochsalzlösung.

Die Fusion der Milzzellen der immunisierten Mäuse mit der Myelomzelllinie P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL 1580) erfolgt gemäß einer Modifikation der ursprünglich von Köhler und Milstein beschriebenen Methode (J. of Imm. Meth. 39 (1980), 285-308). Die fusionierten Zellen werden in RPMI 1640 Medium (das 10 % FKS, 2 mmol/l L-Glutamin und 1 mmol/l Natriumpyruvat, sowie 0,1 mmol/l Hypoxantin und 10 µmol/l Azaserin enthält) kultiviert.

Positive Primärkulturen (Bestimmung gemäß Beispiel 2 und 3) werden 2 Wochen nach Fusion mit Hilfe eines floureszenzaktvierten Zellsorters kloniert. Die Zellen werden dabei einzeln in 96-er Mikrotiterplatten abgelegt.

- 8 -

**Beispiel 2:**

**Bestimmung der Spezifität der produzierten Antikörper**

Um die Spezifität der Antikörper im Kulturüberstand der Hybridomzellen zu erfassen, wird ein Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) angewendet.

Dazu werden 96-er Mikrotiterplatten mit 100 µl Phospholipase A<sub>2</sub> Antigen (5 µg/ml in Carbonatpuffer, Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 726 559) beschichtet, mit 100 µl Kul- turüberstand (1:25 mit PBS (nach Dulbecco und Vogt, J. Exp. Meth. 99 (1954), 167-182) verdünnt) 2 Stunden bei Raumtempe- ratur inkubiert und mit 3 x 350 µl PBS/0,05 % Tween 20 gewa- schen. Nach Zugabe der den Antikörper enthaltenden Probe- lösung wird eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und erneut gewaschen. Danach wird mit POD-markiertem Schaf-anti- Maus-Immunglobulin G (10 mU, Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 13 17 377) 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, mit 3 x 350 µl PBS/0,05 % Tween 20 gewaschen und die Nach- weisreaktion durch Zugabe von 100 µl ABTS® (1 mg/ml, Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 756 407) in 40 mmol/l Citratpuffer pH 4,4 der 3,25 mmol/l Natriumperborat enthält (Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 1204 530) ausgelöst. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wird die Extinktion in einem ELISA-Reader bei 405 nm bestimmt.

**Beispiel 3:**

**Test auf Inhibierung der enzymatischen Aktivität**

Humane duodenale Phospholipase A<sub>2</sub> (s. Beispiel 1) wird mit Trispuffer aus der Testkombination "Freie Fettsäuren" (Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 1056 239) verdünnt.

20 µl dieser Enzymlösung wird 15 min. bei 25°C mit 10 µl der zu untersuchenden Antikörperlösung in verschiedenen Konzentrationen (s. Tab. 1) inkubiert. Anschließend wird 20 µl Substrat (Lecithinemulsion aus der Testkombination "Freie Fettsäuren", Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 1056 239) zugegeben und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die hierbei durch die Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität freigesetzten Fettsäuren werden mittels der Testkombination "Freie Fettsäuren" (Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 1383 175) durch Messung der Extinktion gemäß Angaben des Herstellers quantifiziert. Die Ergebnisse sind in %-Hemmung im Vergleich zur Enzymaktivität ohne Antikörper in der folgenden Tabelle 1, sowie in Figur 1, dargestellt (jeweils Mittelwerte aus 3 Bestimmungen).

Tabelle 1:

Probe	Konz (µg/ml)	%-Hemmung
DSM ACC2025	100	97
	10	93
	1	86
	0,1	56
	0,01	16
DSM ACC2026	100	97
	10	94
	1	88
	0,1	56
	0,01	20

**Beispiel 4:****Bestimmung der Epitopüberlappung von Antikörpern gegen Phospholipase A<sub>2</sub>**

Zum Nachweis der Epitopüberlappung eines Antikörpers mit dem monoklonalen Antikörper DSM ACC 2025 oder DSM ACC2026 wird ein kompetitiver Enzymimmunoassay durchgeführt.

Dazu wird Phospholipase A<sub>2</sub> zunächst mit D-Biotinyl-ε-amido-capronsäure-N-hydroxysuccinimidester (Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 1008 960) gemäß Angaben des Herstellers biotinyliert. Von diesem biotinylierten Antigen werden 300 ng in einem Volumen von 100 µl PBS durch einstündige Inkubation bei Raumtemperatur an eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte (Herstellung nach EP-A 0 344 578) gebunden. Nach viermaligem Waschen mit PBS/0,05 % Tween 20 wird 90 Minuten bei Raumtemperatur simultan inkubiert mit dem monoklonalen Antikörper DSM ACC2025 bzw. DSM ACC2026, der mit Peroxidase markiert wurde (Endkonzentration 250 mU/ml) und dem zu beurteilenden Antikörper. Nach erneutem viermaligem Waschen mit PBS/0,05 % Tween 20 wird mit der Enzymsubstratlösung ABTS® in Natriumperborat enthaltendem Puffer (s. Beispiel 2) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Extinktion bei 405 nm als Maß für die Menge des gebundenen POD-markierten monoklonalen Antikörpers DSM ACC2025 bzw. DSM ACC2026 gemessen. Dieser Wert wird verglichen mit der Extinktion, die erhalten wird, bei Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper DSM ACC2025 bzw. DSM ACC2026 allein. Wenn bis zum einem 10<sup>5</sup>-fachen Überzehrung kein beurteilendem Antikörper gegenüber dem monoklonalen Antikörper DSM ACC2025 bzw. DSM ACC2026 als Enzymkonjugat (250 mU/ml) mindestens 50 % Kompetition zu erkennen sind, liegt eine Epitopüberlappung vor.

**Beispiel 5:**

Inhibierung der PLA<sub>2</sub>-TypI-induzierten PGE<sub>2</sub>- und LTC<sub>4</sub>-Ausschüttung durch humane Leukozyten in Gegenwart eines monoklonalen Antikörpers gegen die Phospholipase A<sub>2</sub>

Humane Leukozyten werden durch Dichtezentrifugation (Lymphozytentrennmedium der Boehringer Mannheim GmbH, Kat.-Nr. 295949) aus peripherem Blut isoliert und auf einen Zelltiter von  $0,75 \times 10^6$  Zellen/ml in 125 mmol/l Trispuffer aus der Testkombination "Freie Fettsäuren" (Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 1056 239) eingestellt. Verschiedene Konzentrationen von gereinigter humaner Phospholipase A<sub>2</sub> (siehe Beispiel 1 und Tabelle 2) werden mit einer Lösung des monoklonalen Antikörpers DSM ACC2026 (Konzentration siehe Tabelle 2) und den humanen Leukozyten für 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen für 10 Min. bei 800 g abzentrifugiert und in den Überständen die PGE<sub>2</sub>- und LTC<sub>4</sub>-Konzentration über einen Radioimmunoassay (Biermann, Bad Nauheim, Deutschland, für PGE<sub>2</sub> und NEN DuPont, Dreieich, Deutschland, für LTC<sub>4</sub>) bestimmt. Die Ergebnisse von jeweils zwei unabhängigen Versuchen (humane Leukozyten von zwei verschiedenen Spendern) sind in der nachfolgenden Tabelle 2 angegeben (jeweils Mittelwerte von drei Bestimmungen). In den positiven Kontrollansätzen (Inkubation mit Phospholipase A<sub>2</sub> Typ I, aber ohne monoklonalen Antikörper gegen diese Phospholipase A<sub>2</sub>) ist deutlich die PLA<sub>2</sub>-induzierte Stimulierung der Ausschüttung der Entzündungsmediatoren PGE<sub>2</sub> und LTC<sub>4</sub> durch humane periphere Lymphozyten zu erkennen. Diese in vivo zu einer Entzündungsreaktion führende Ausschüttung von PGE<sub>2</sub> und LTC<sub>4</sub> kann durch Zugabe eines monoklonalen Antikörpers gegen die TypI-Phospholipase A<sub>2</sub> deutlich gehemmt werden.

- 12 -

Tabelle 2

PLA <sub>2</sub> -Typ I	MAK<PLA <sub>2</sub> > DSM ACC2026	PGE <sub>2</sub> [ng/ml]		LTC <sub>4</sub> [ng/ml]	
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
-	-	0,82	1,99	0,17	0,19
1 mg/ml	-	5,42	9,13	0,87	0,91
-"-	0.1 mg/ml	2,18	4,13	0,24	0,25
-"-	0.01 mg/ml	3,23	5,20	0,31	0,28
-"-	0.001 mg/ml	4,72	8,89	0,49	0,77
0,1 mg/ml	-	2,16	4,44	0,23	0,32
-"-	0.1 mg/ml	0,97	2,53	0,17	0,20
-"-	0.01 mg/ml	1,29	2,74	0,16	0,19
-"-	0.001 mg/ml	1,63	3,13	0,21	0,17
0,01 mg/ml	-	1,05	2,44	0,17	0,15
-"-	0.1 mg/ml	0,74	2,17	0,13	0,13
-"-	0.01 mg/ml	0,82	1,99	0,13	0,12
-"-	0.001 mg/ml	0,97	1,73	0,14	0,14

**P a t e n t a n s p r ü c h e**

1. Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen die Typ I Phospholipase A<sub>2</sub>, der bei einer Konzentration von weniger als 100 ng/ml eine mindestens 50 %-ige Hemmung der Aktivität der Phospholipase A<sub>2</sub> bewirkt, oder eines funktionellen Fragments dieses Antikörpers zur Herstellung eines Therapeutikums, das bei Entzündungserscheinungen, speziell bei akuter Pankreatitis eingesetzt werden kann.
2. Pharmazeutische Formulierung, bestehend aus einem monoklonalen Antikörper gegen die Typ I Phospholipase A<sub>2</sub>, der bei einer Konzentration von weniger als 100 ng/ml eine mindestens 50 %-ige Hemmung der Aktivität der Phospholipase A<sub>2</sub> bewirkt, oder eines funktionellen Fragments dieses Antikörpers gegebenenfalls zusammen mit den üblichen pharmazeutischen Träger-, Füll-, Hilfs- und Zusatzstoffen.
3. Monoklonaler Antikörper gegen die Typ-I-Phospholipase A<sub>2</sub>, der in äquivalenter Weise an die Typ-I-Phospholipase A<sub>2</sub> bindefähig ist, wie ein aus den Zelllinien DSM ACC2026 und/oder DSM ACC2025 erhältlicher monoklonaler Antikörper.
4. Monoklonaler Antikörper gegen die Typ-I-Phospholipase A<sub>2</sub>, erhältlich aus der Zelllinie DSM ACC2026 oder DSM ACC2025.

- 14 -

5. Zelllinie DSM ACC2026.

6. Zelllinie DSM ACC2025.

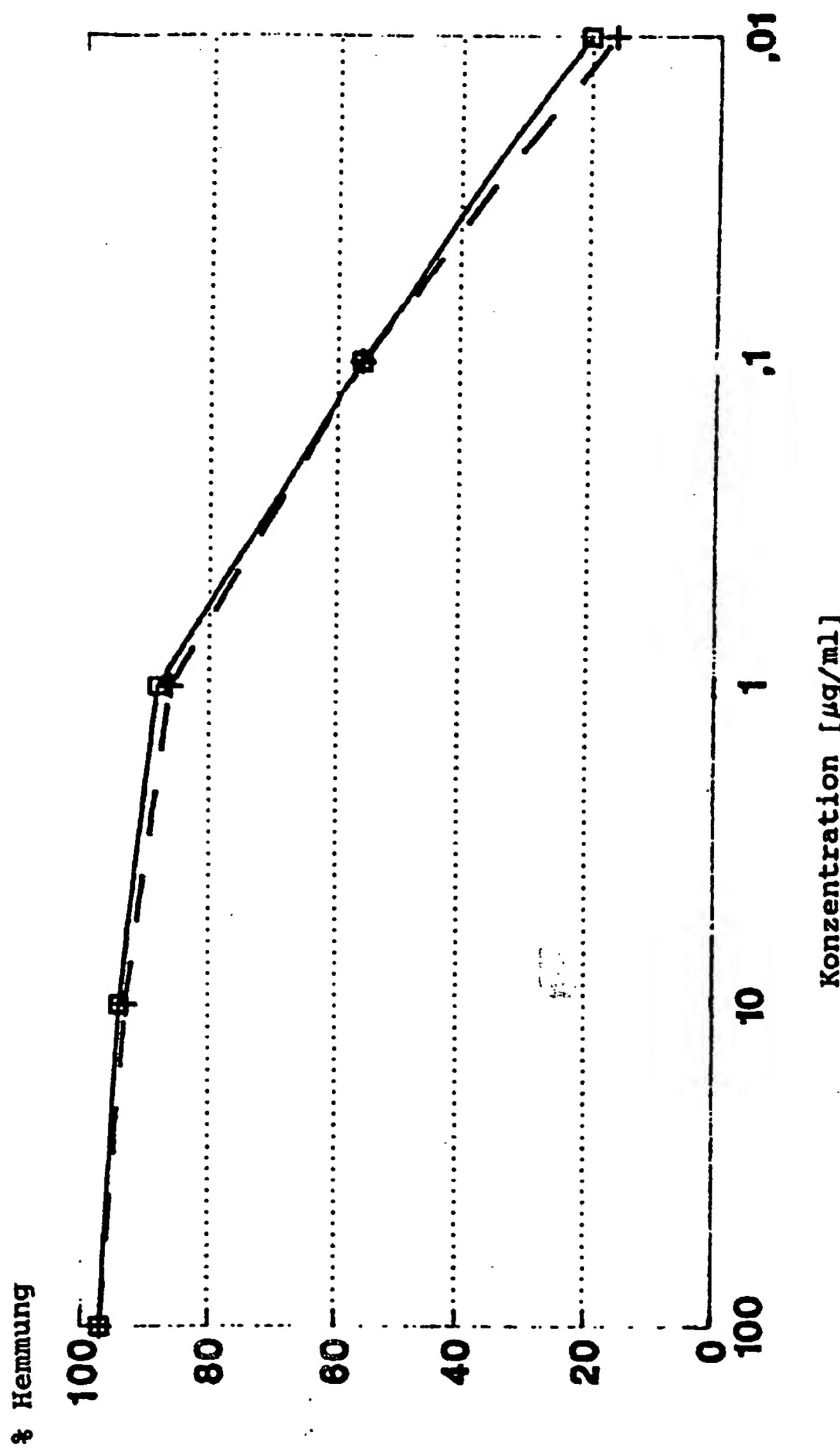


Fig.1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 94/02905

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.<sup>5</sup> A 61 K 39/395, C 07 K 15/28, C 12 P 21/08, C 12 N 5/00  
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>5</sup> A 61 K, C 07 K, C 12 P, C 12 N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP, A2, 0 287 397 (SHIONOGI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA). 19 October 1988 (19.10.88) claims 1,2	3,4
A	claims 1,2,6-8	
A	EP, A2, 0 459 450 (SHIONOGI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 4 December 1991 (04.12.91) claims	1,2 1-4
A	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, volume 167, No. 3, 1990, K. TAKAYAMA et al. "Monoclonal Antibodies Against Human Synovial Phospholipase A2" pages 1309 - 1315, page 1309	3,4
	-----	

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  16 March 1993 (16.03.93)	Date of mailing of the international search report  26 March 1993 (26.03.93)
Name and mailing address of the ISA/  European Patent Office  Facsimile No.	Authorized officer  Telephone No.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

Int.Cl<sup>5</sup> A 61 K 39/395, C 07 K 15/28, C 12 P 21/08, C 12 N 5/00

## II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff<sup>7</sup>

Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole
Int.Cl. <sup>5</sup>	A 61 K, C 07 K, C 12 P, C 12 N

Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen<sup>8</sup>III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN<sup>9</sup>

Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>
X	EP, A2, 0 287 397 (SHIONOGI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 19 Oktober 1988 (19.10.88), Ansprüche 1,2. Ansprüche 1,2,6-8. --	3, 4
A	EP, A2, 0 459 450 (SHIONOGI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 04 Dezember 1991 (04.12.91), Ansprüche. --	1, 2
A	EP, A2, 0 459 450 (SHIONOGI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 04 Dezember 1991 (04.12.91), Ansprüche. --	1-4
A	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Band 167, Nr. 3, 1990, K. TAKAYAMA et al. "Monoclo- nal Antibodies Against Human Synovial Phospholipase A2"	3, 4

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup>:"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist  
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelddatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelddatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelddatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

"g" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

## IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  16 März 1993	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts  26 MAR 1993
Internationale Recherchenbehörde  Europäisches Patentamt	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten  WOLF e.h.

Seiten 1309-1315,  
Seite 1309.

## ANHANG Best Available Copy

Zur Interpretation der nachstehenden  
Angaben die Informationen  
Patentanmeldung Nr.

## ANNEX

(to the International Search)  
Application No.

PCT/EP92/02905 SAE 67778

In diesem Anhang sind die Mitglieder  
der Patentfamilien der in obenge-  
nannten internationalen Recherchenbericht  
angeführten Patentdokumente angegeben.  
Diese Angaben dienen nur zur Unter-  
richtung und erfolgen ohne Gewähr.

This Annex lists the patent family  
members relating to the patent documents  
cited in the above-mentioned inter-  
national search report. The Office is  
in no way liable for these particulars  
which are given merely for the purpose  
of information.

## ANNEXE

(à l'Office de recherche internationale)  
Demande de brevet à la demande internationale

La présente annexe indique les  
membres de la famille de brevets  
relatifs aux documents de brevets cités  
dans le rapport de recherche inter-  
national visée ci-dessus. Les renseigne-  
ments fournis sont donnés à titre indica-  
tif et n'engagent pas la responsabilité  
de l'Office.

In Recherchenbericht angeführtes Patentdokument Patent document cited in search report Document de brevet cité dans le rapport de recherche	Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication	Mitglied(er) der Patentfamilie Patent family member(s) Membre(s) de la famille de brevets	Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication
EP A2 287397	19-10-88	EP A3 287397 JP A2 63258898 US A 4978609	22-11-90 26-10-88 18-12-90
EP A2 459450	04-12-91	EP A3 459450 JP A2 4036193	11-12-91 06-02-92